Beiträge

zur

Kenntniss des pharmakologischen und physiologisch-chemischen Verhaltens einiger flüchtiger Stoffe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen medicinischen Fakultät der Landes-Universität Rostock

vorgelegt von

Hans Kleist
aus Berlin.

Rostock
H. Winterberg's Buchdruckerei
1903.

Gedruckt mit Genehmigung der medicinischen Fakultät der Landes-Universität zu Rostock.

Referent: Prof. Dr. R. Kobert.

Seinen Eltern

in Liebe und Dankbarkeit

gewidmet vom

Verfasser.

Aus dem Institut für Pharmakologie und Physiologische Chemie zu Rostock i. M.

Beiträge

zur

Kenntniss des pharmakologischen und physiologisch-chemischen Verhaltens einiger flüchtiger Stoffe

von

Hans Kleist.

---

1. Anthranilsäure als Natronsalz.
2. Acetylverbindung des Anthranilsäuremethylesters.
3. Methylanthranilsäuremethylester als Sulfatsalz.
4. Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters.
5. Piperonal.

Ungemein gross ist die Zahl der Pflanzen, welche ätherische Oele enthalten, und nicht gering auch die Zahl der Indicationen, mit welchen diese Pflanzen und ihre Oele in den verschiedensten Ländern seit Alters her angewandt werden. Der wissenschaftlichen Pharmakologie muss daran liegen, festzustellen, welchen Bestandtheilen der zumeist ja sehr bunt zusammengesetzten ätherischen Oele die betreffenden Wirkungen zukommen. Zur Lösung dieser Frage giebt es nur einen und noch dazu sehr mühsamen Weg, nämlich den, die Oele in ihre Bestandtheile zu zerlegen und jeden derselben für sich auf sein physiologisch-chemisches und pharmakologisches Verhalten zu prüfen. Die Zerlegung der Oele ist von einzelnen Chemikern, wie namentlich von Wallach, sowie von der Firma Schimmel & Co., seit Jahren in Angriff genommen; die Prüfung der von jenen isolirten Bestandtheile auf ihre Wirkung hinkt dagegen sehr nach. Möge das Nachstehende einen kleinen Beitrag zur Lösung dieser Aufgabe bilden.

Der Güte des Herrn Prof. Dr. Rudolf Kobert habe ich es zu verdanken, dass mir die Anthranilsäure und einige Ester derselben, ferner das Piperonal[1]) zur Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften wie der Schicksale derselben im thierischen Organismus überlassen wurden.

Abgesehen von dem Piperonal, fand ich Angaben in der Litteratur über das physiologisch-chemische und pharmakologische Verhalten dieser Substanzen nicht vor.

Anthranilsäure und einige Ester derselben.

Die Anthranilsäure

$$C_7H_7NO_2 = C_6H_4 \begin{cases} NH_2 & (1) \\ COOH & (2) \end{cases}$$

ist Orthoamidobenzoësäure. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 144 bis 145°. Die sublimirbare Säure zerfällt beim Destilliren in Anilin und CO_2. In Wasser und Alkohol ist sie leicht löslich; die wässerige Lösung schillert blau und schmeckt leicht süss. Die Anthranilsäure krystallisirt in Blättchen oder trimetrischen Krystallen. Platin- und Goldsalze werden

[1]) Diese Substanzen wurden von der Firma Schimmel & Co. freundlichst zur Verfügung gestellt. Noch nachträglich spreche ich meinen Dank dafür aus.

durch Anthranilsäure schon in der Kälte reducirt, ebenso Kaliumpermanganat, dagegen auch in der Wärme nicht Kaliumchromat, Kaliumbichromat, Kupfer- und Silbersalz, letzteres selbst nicht nach Zusatz von Ammoniak. Fügt man einer wässerigen Anthranilsäurelösung Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid hinzu, so fällt ein blauer Niederschlag aus. Das Natronsalz bildet bräunlichgelbe Blättchen, die sich sehr leicht in Wasser lösen. In wässeriger Lösung entsteht nach Zusatz von Kalium-Wismut-Jodid ein gelbroter Niederschlag.

Die Anthranilsäure kommt zwar in ätherischen Oelen, wie es scheint, nicht vor; da jedoch Derivate derselben sich in gewissen Oelen finden, musste eine wissenschaftliche Untersuchung dieser Ester mit einer Prüfung der Anthranilsäure beginnen.

Zu den Thierversuchen wurde stets das anthranilsaure Natron gewählt.

Versuch 1. Ein Frosch, Gewicht 44 g (es wurde zu allen Versuchen mit Anthranilsäure und ihren Estern *Rana esculenta* verwandt), erhielt 0,05 anthranilsaures Natron (in Wasser gelöst). An der Injectionsstelle entfärbte sich fast augenblicklich das grüne und schwarze Hautpigment in einem ziemlich scharf begrenzten Bezirke von etwa 1 cm Durchmesser, so dass hier die Haut ein schmutziggelbes Colorit annahm, das in Folge bald hinzutretender Hyperaemie durch einen röthlichen Ton nüancirt wurde. Der Weg, den das Natronsalz im Lymphsack nach dem Beckengürtel zu nahm, wurde ebenfalls durch leichte Pigmententfärbung markirt. Im Laufe des Tages traten die natürlichen Farben wieder deutlicher hervor und nach 24 Stunden hatten die ehedem entfärbten Hautbezirke wieder normales Aussehen. Gleiche oder ähnliche Erscheinungen nach Injectionen von anthranilsaurem Natron wurden später nicht mehr, weder bei demselben Frosch, noch bei anderen beobachtet. Im übrigen hatte diese Dosis des Natronsalzes keine augenscheinliche Wirkung auf den Organismus.

Versuch 2. Derselbe Frosch erhielt 0,2 g anthranilsaures Natron. Nach 4 Stunden fühlte das Thier sich sehr matt und kroch, wenn es mechanisch gereizt wurde, langsam und schwerfällig vorwärts. Rückenlage wurde ertragen. Nach 5 Stunden traten in Rückenlage sehr leichte tonische Krämpfe und langsame, unregelmässige und uncoordinirte Bewegungen des Rumpfes, Kopfes und der Extremitäten auf. Diese uncoordinirten Bewegungen waren nach 6 Stunden nur noch äusserst schwach, die Reflexe kaum sichtbar. Nach 22 Stunden war das Tier scheinbar todt; ein in die Brust geschnittenes Fensterchen liess aber erkennen, dass das Herz noch schlug. Nach 44 Stunden wurde das Thier todt aufgefunden.

Versuch 3. Ein Frosch, 60 g wiegend, erhielt 0,1 g anthranilsaures Natron. Keine Folgeerscheinungen beobachtet.

Versuch 4. Ein Frosch von 38 g erhielt 0,15 g anthranilsaures Natron injicirt. Nach 5 Stunden reagirte das Thier auf Reize wenig; uncoordinirte und tonische Bewegungen waren angedeutet. Nach 10 Stunden waren keine Reflexe mehr auszulösen. Der Tod trat nach ungefähr 40 Stunden ein. Die Section ergab eine Hyperaemie des Magen-Darmtractus und des Mesenteriums mittleren Grades. Die Mundschleimhaut hatte sich an der Hyperaemie nicht betheiligt.

Versuch 5. Ein Frosch, 45 g, erhielt 0,15 g anthranilsaures Natron subcutan. Nach 3 Stunden machte der Frosch nur wenige und vergebliche Anstrengungen von Rückenlage in Bauchlage zu kommen. Die

Bewegungen wurden zunehmend schwächer, die Reflexe waren nach $3^1/_2$ Stunden fast erloschen. Am Rumpf, besonders aber an den Extremitäten traten leichte Reizungserscheinungen auf, die sich in schwachen, uncoordinirten Bewegungen kundgaben. Einmal trat sogar ein wenige Sekunden dauernder Opisthotonus auf. Nach 5 Stunden war das Thier reactionslos und wurde nach 18 Stunden leichenstarr aufgefunden.

Section: Im stark hyperämischen Magen fand sich blutiger Schleim, das Mesenterium zeigte leichte, die Mundhöhlen- und die Magen-Darmschleimhaut nur sehr geringe Hyperämie; nur das Rectum war stärker injicirt. Die Nerven und Muskeln reagierten auf electrische Reize normal.

Versuch 6. Ein 50 g schwerer Frosch — derselbe war durch frühere Versuche schon etwas geschwächt — erhielt 0,1 g anthranilsaures Natron subcutan. Schon nach einer Stunde war das Thier sehr matt. Der Tod trat nach 4 Stunden ein.

Section: Das Mesenterium war nicht hyperämisch. Der Verdauungstractus war mit Ausnahme der Mundschleimhaut leicht injicirt. Im Magen fand sich blutiger Schleim.

Versuch 7. Ein mittlerer Frosch erhielt 0,1 g anthranilsaures Natron. Es traten auch nicht die geringsten Erscheinungen auf.

Versuch 8. Ein Frosch von 58 g erhielt an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 0,15 g, am dritten 0,2 g anthranilsaures Natron. Die Injectionen wurden ebenfalls ohne Folgeerscheinungen vertragen.

Versuch 9 und 10. Ein Frosch von 68 g erhielt 0,2 g, ein anderer von 60 g 0,15 g anthranilsaures Natron. Irgendwelche Folgeerscheinungen stellten sich nicht ein.

Versuch 11. Ein 69 g schwerer Frosch erhielt 0,4 g anthranilsaures Natron. Nach 4 Stunden wurden noch einzelne uncoordinierte Bewegungen wahrgenommen; die Reflexe waren völlig erloschen, die Herzaction bedeutend verlangsamt. Nach $4^3/_4$ Stunden wurden 0,000075 g Strychninum nitricum injicirt. Nach 6 Stunden (also $1^1/_4$ Stunden nach der Strychnininjection) traten auf Reize Zuckungen und kurzdauernde, leichte Krämpfe der Extremitäten auf. An der Rumpfmuskulatur machte sich keine Strychninwirkung bemerkbar. Nach 18 Stunden wurde das Thier todt aufgefunden.

Die Anthranilsäure lähmt demnach bei Fröschen das Centralnervensystem. Die allerdings leichten tonischen Krämpfe, die vor der vollständigen Lähmung beobachtet wurden, beruhen wohl zweifellos auf geringer und vorübergehender Reizung der Muskeln oder peripheren Nerven, die ataktischen Bewegungen dagegen sind wahrscheinlich durch relativ frühzeitige Lähmung centripetaler Leitungsbahnen und dadurch hervorgerufenen Verlust der controllirenden Empfindungen bei noch relativ gut erhaltener motorischer Kraft bedingt. Strychnin in grossen Dosen lässt zwar die bereits erloschenen Reflexe wieder etwas aufflackern, vermag aber die lähmende Wirkung der Anthranilsäure nicht völlig aufzuheben und den Tod nicht aufzuhalten. Die letale Dosis beträgt ungefähr 3,0 g pro Kilo Frosch.

Der 24stündige Harn mehrerer Frösche, welche eine Anthranilsäure-Injection erhalten hatten, wurde gesammelt. Nach Zusatz von Kalium-Wismut-Jodid trat ein starker Niederschlag von gelbroter Farbe auf. Die Harne wurden jetzt filtriert, der Rückstand auf dem Filter gesammelt

und mit Kalilauge versetzt, dann abermals filtriert und das Filtrat mit Schwefelsäure genau neutralisiert. Nachdem dieses neutrale Filtrat eingedampft war, wurde es mit Alkohol mehrere Male extrahirt, der Alkohol wieder verjagt und der geringe Rückstand mit Essigsäure angesäuert und mit essigsaurem Kupfer wieder gefällt. Die so erhaltene Flüssigkeit wurde, um sie vom Kupfer zu befreien, mit Schwefelwasserstoff behandelt und filtrirt. Das Filtrat hatte eine schwach gelbliche Farbe und fluorescirte leicht blau. Zur Bestimmung des Schmelzpunktes erwies sich nach langsamer Verdampfung des Wassers die rückständige Substanz als zu minimal. Doch konnte die Fluorescenz nur durch Anthranilsäure bedingt sein.

Wenn 3,0 g pro Kilo erst die letale Dosis der Anthranilsäure für Frösche ist, so lässt sich irgend eine stärkere Giftwirkung dieser Substanz auf Warmblüter kaum erwarten.

Versuch 12. Einem Kaninchen wurde 1,0 g anthranilsaures Natron injicirt, ohne dass sich irgend welche Erscheinungen einstellten. Die in 24 Stunden erhaltene Harnmenge betrug 30 ccm, reagirte alkalisch und enthielt weder Zucker noch Eiweiss. Anilin konnte im Harn mittels Chlorkalk nicht nachgewiesen werden. Der Harn wurde nun mit Alkali versetzt, um ihn auf Hippursäure zu untersuchen, zur Syrupdicke eingedampft, der Rückstand wiederholt mit kaltem Alkohol ausgezogen, der alkoholische Auszug eingedampft, mit Salzsäure versetzt und wiederholt mit Essigäther ausgeschüttelt. Um etwa vorhandene Benzoësäure zu isoliren, wurde nach Verjagung des Essigäthers der Rückstand mit Petroläther extrahirt. Es liessen sich aber auch nicht Spuren von Benzoësäure nachweisen. Der Rückstand aus dem Essigäther wurde mit Alkohol aufgenommen. Es trat sofort prachtvolle blaue Fluorescenz auf, die nur auf Anwesenheit von Anthranilsäure beruhen konnte. Die eine Hälfte des Alkohols wurde abgegossen, der Alkohol verjagt und der Rückstand mit Wasser aufgenommen. Nach Zusatz von Kalium-Wismut-Jodid trat ein gelbroter Niederschlag auf, die reine Anthranilsäure konnte aber nicht wieder gewonnen werden.

In der anderen Hälfte des Alkohols schwammen auf dem Boden des Gefässes einige Krystalle, die sich schwer in kaltem Alkohol, nicht in Aether lösten. Mittels Aether liessen sie sich sehr gut von der noch anhaftenden Schmiere befreien. In heissem Wasser lösten sich die Krystalle. Nach langsamer Verdampfung des Wassers fanden sich unter dem Mikroskope erstens kleine rhombische Prismen, zweitens in Drusenform angeordnete Krystalle. Die Ausbeute war zu gering, um irgend welche Bestimmungen zu machen. Anorganische Bestandtheile waren in den Krystallen nicht enthalten.

Versuch 13. Selbst 5,0 g anthranilsaures Natron, die einem mittleren Kaninchen subcutan eingespritzt wurden, übten keine Wirkung aus. Der Harn, welcher in 48 Stunden gesammelt wurde, reagirte alkalisch und reducirte Kupferlösung in der Wärme nicht. Die Gährungsprobe fiel negativ aus. In ungefähr 15 ccm Harn, die mit der Phenylglycosazonprobe untersucht wurden, fanden sich im Bodensatz nur ganz vereinzelte und wenige sternförmige Krystalle, die nur schlecht ausgebildet waren, obgleich der Harn sehr langsam im Wasserbade abgekühlt wurde. Immerhin bewiesen sie, dass der Harn Spuren von Zucker enthielt.

Auch geringe Spuren von Eiweiss liessen sich mit Esbachs Reagenz und mittels der Unterschichtungsprobe mit Salpetersäure nachweisen.

Der Harn wurde mit Natron noch etwas stärker alkalisch gemacht, zur Syrupdicke eingedampft, mehrere Mal mit Alkohol extrahirt, der alkoholische Auszug eingedampft, der Rückstand mit Salzsäure versetzt und wiederholt mit Essigäther ausgeschüttelt. Der Essigäther fluorescirte

intensiv. Da die Fluorescenz für den Nachweis der Anthranilsäure genügte, wurde es unterlassen, die Säure rein darzustellen. Nach Verjagung des Essigäthers wurde der Rückstand mit Wasser aufgenommen, mit Natron alkalisch gemacht, filtrirt und mit Salzsäure im Ueberschuss angesäuert. Es liessen sich aber keine Krystalle wie im vorigen Versuch gewinnen.

Der Rest des eingedampften Harnes wurde schliesslich mit Salzsäure angesäuert, abermals eingedampft und mit Alkohol und Essigäther behandelt. Die Fluorescenz des letzteren war nur sehr schwach. Auch diesmal liessen sich keine Krystalle gewinnen.

Versuch 14. 2,0 g anthranilsaures Natron (subcutan) riefen bei demselben Kaninchen weder eine Eiweiss- noch eine Zuckerausscheidung hervor. Die Resultate der Untersuchung des Harnes waren dieselben wie in Versuch 13.

Versuch 15. Ein mittlerer Hund erhielt 2,0 g anthranilsaures Natron subcutan. Keine Wirkung. In dem 48stündigen Harn fand sich weder Zucker noch Eiweiss. Der mit Natron alkalisch gemachte Harn wurde zum Syrup eingedampft und auf Hippursäure untersucht. Es blieb ein Rückstand übrig, der sich in kaltem Wasser erst nach Zusatz von Natronlauge löste. Nachdem die Lösung mit Salzsäure im Ueberschuss angesäuert war, fiel die Substanz wieder aus. Der nach dem Filtrieren auf dem Filter gesammelte Rückstand wurde auf diese Weise mehrere Mal gereinigt. Die Substanz hat sauren Character und bildet mit Basen Salze; ebenso wie die Hippursäure ist sie in kaltem Wasser und in Aether sehr schwer löslich, löst sich besser in kaltem Alkohol und Essigäther und heissem Wasser, sehr leicht in heissem Alkohol und heissem Essigäther. Die Krystalle dieser Säure gleichen völlig denen der Hippursäure, doch handelt es sich nicht um Hippursäure, deren Schmelzpunkt bei 188° liegt. Der Schmelzpunkt dieser Säure liegt zwischen 315° und 318°. Mittels Kalium, Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid konnte die Anwesenheit von Stickstoff nachgewiesen werden.

Versuch 16. Derselbe Hund erhielt eine Injection von 4,0 g anthranilsaurem Natron. Der 18stündige Harn, der leicht fluorescirte, reagirte alkalisch, enthielt kein Eiweiss und reducirte Kupferlösung schon in der Kälte. Da diese Reduction in der Kälte wohl nur durch Zucker bedingt sein konnte, musste es merkwürdig erscheinen, dass die Gährungsprobe negativ ausfiel. Es wurden nun zur Kontrolle zwei Gährröhrchen mit einer gleichprocentigen Zuckerlösung angesetzt. Dem einen wurde 0,05 g anthranilsaures Natron zugefügt und soviel Weinsäure, dass die Flüssigkeit schwach sauer reagirte. Nach 6 Stunden war in dem einen Röhrchen der Gährungsprozess beendet, während in dem anderen, dem die Substanz beigemengt war, sich noch keine Kohlensäure entwickelt hatte. Erst nach 24 Stunden hatte sich noch nicht halb soviel Kohlensäure gebildet wie in dem anderen Röhrchen. Eine weitere Gährung trat aber in den nächsten 24 Stunden nicht mehr ein. Die Anthranilsäure, beziehungsweise ihr Salz wirkt also auf Hefe ein und verlangsamt, schränkt somit den Gährungsprozess bedeutend ein.

Der sichere Nachweis des Zuckers im Harn wurde durch die Phenylglycosazonprobe erbracht. Es fanden sich viele und gut ausgebildete Krystalle von der characteristischen Form.

Aus dem Zuckernachweis und dem negativen Resultat der Gährungsprobe lässt sich folgern, dass der Harn Anthranilsäure enthielt und zwar in so reichlicher Menge, dass er auf Hefe einwirken konnte.

Der Harn wurde nun in derselben Weise wie in Versuch 13 behandelt. Der Alkohol, ebenso der Essigäther fluorescirte schön blau. Aber jene Säure, welche ich in Versuch 15 erhielt, konnte nicht dargestellt werden.

Versuch 17. Ein kleiner Hund, ungefähr 16 Pfund wiegend, erhielt 5,0 g anthranilsaures Natron subcutan. Nach 24 Stunden bekam das Thier Diarrhöe und frass am zweiten Tage garnichts. Am dritten Tage war es wieder völlig gesund.

Der in 48 Stunden gesammelte Harn war alkalisch, fluorescirte blau, enthielt kein Eiweiss und reducirte Kupferlösung in der Kälte. Die Gährungsprobe war negativ, die Phenylglycosazonprobe positiv. Trotz sorgsamster Untersuchung (vergl. Versuch 13) liess sich nicht die beim ersten Versuch am Hunde gewonnene Säure darstellen.

Versuch 18. Ich nahm per os 2,0 g anthranilsaures Natron zu mir, und zwar zweimal je 1,0 g mit einer Pause von 2 Stunden. Eine halbe Stunde nach jeder Einführung trat ein leichter Schweissausbruch auf, ohne dass die Temperaturen anstiegen. Ungefähr 3 Stunden nach der letzten Einnahme machte sich eine zwar geringe, aber doch lästige Salivation bemerkbar. Wenn man von einem geringen Unbehagen im Unterleib, welches 12 bis 15 Stunden nach der Einnahme eintrat, absieht, blieben Störungen von Seiten des Magen-Darmkanals aus. Der Stuhl war normal. Der Harn, welcher in 48 Stunden gesammelt war, reagirte sauer, fluorescirte äusserst intensiv, enthielt kein Eiweiss und reducirte Kupferlösung. Die Gährprobe fiel negativ, die Phenylglycosazonprobe positiv aus. Nach Zusatz von Natron verschwand die Fluorescenz. Auf die Isolirung der Anthranilsäure wurde verzichtet. Hippursäure, Benzoësäure oder irgend eine andere organische Säure liess sich aus dem Harn, welcher ebenso wie der in Versuch 13 behandelt wurde, nicht gewinnen.

Diese Versuche zeigen, dass beim Warmblüter das Einspritzen oder Eingeben von Anthranilsäure in bedeutenden Dosen ohne andauernden Schaden ertragen wird. Allenfalls kommt es zu leichter Diarrhöe und Salivation. Die Substanz findet sich im Harn unverändert wieder und kann schon ohne chemische Untersuchung durch die Fluorescenz erkannt werden. Neben der Substanz tritt im Harn des Menschen und Hundes Zucker auf, in dem von Kaninchen aber nicht oder bei sehr grossen Dosen nur spurweise. Derselbe lässt sich durch die Phenylglycosazonprobe ohne weiteres, durch die Gährungsprobe aber nicht ohne weiteres nachweisen, da unsere Substanz, wie viele andere reducirende Körper, die Gährkraft der Hefe beeinträchtigt.

Auf Bacterien konnte keine Einwirkung der Anthranilsäure festgestellt werden.

Je 1 ccm einer 3 procentigen Lösung von anthranilsaurem Natron wurde zu Culturen von *Bacterium Coli*, *Staphylococcus albus* und *Bacillus subtilis* gethan, welche in ungefähr 4 ccm Pepton-Wasser geimpft waren. Nachdem die Substanz 48 Stunden bei einer constanten Temperatur von 34° mit den Bacterien in Berührung gewesen war, wurden die Culturen auf alkalischen Pepton-Agar geimpft. Das Wachstum derselben war kräftig und zeigte keinen Unterschied zwischen demjenigen von Controllculturen, die nicht mit Anthranilsäure behandelt waren. Das anthranilsaure Natron übt demnach in einer

0,06 procentigen Lösung bei einer Einwirkung von 48 Stunden auf *Bacterium Coli*, *Staphylococcus albus* und *Bacillus subtilis* keinen nachweisbaren Einfluss aus.

Ebenso war kein Einfluss des Natronsalzes der Anthranilsäure auf Blutfarbstoff und auf rote Blutkörperchen zu constatiren.

Acetylverbindung des Anthranilsäuremethylesters.

Der Methylester der Anthranilsäure

$$C_8H_9NO_2 = C_6H_4 \begin{cases} NH_2 & (1) \\ COO \cdot CH_3 & (2) \end{cases}$$

wurde als Bestandtheil des Orangenblüthen-Oels (Neroli-Oel) im Jahre 1894 im Laboratorium von Schimmel & Co. entdeckt. Er spielt bei der Bildung des Orangenblüthen-Aromas eine wichtige Rolle. In dem Orangenblüthen-Oel finden sich ca. 5 Procent Methylester. Der Schmelzpunkt dieser Verbindung liegt bei 25,5°. Die Lösungen fluoresciren schön blau. Der Gesammtgeruch ist in unverdünntem Zustande unangenehm und erinnert erst in entsprechender Verdünnung an den Duft der Orangenblüthen. Beim Destilliren einer Lösung von Anthranilsäuremethylester in Wasser geht der Ester mit in die Vorlage über. Der Ester hat basische Eigenschaften.

Die Acetylverbindung des Anthranilsäuremethylesters

$$C_{10}H_{11}NO_3 = C_6H_4 \begin{cases} NH \cdot COCH_3 & (1) \\ COOCH_3 & (2) \end{cases}$$

bildet ein loses, flockiges, geruch- und geschmackloses Pulver von weisser Farbe und besitzt die Fähigkeit, zu sublimiren. In kaltem oder heissem Wasser ist sie schwer, in Alkohol, Aether und concentrirter Salzsäure leicht löslich. Ihre Lösungen fluoresciren nicht. Aus Wasser krystallisirt die Acetylverbindung in zarten Nadeln. Lösungen von Kupfer-, Silber-, Gold-, Platinsalzen, Kaliumchromat und Kaliumpermanganat werden durch sie nicht reducirt. Mit Platinchlorid bildet sie ein Doppelsalz, das in schönen, langen Nadeln auskrystallisirt. Durch mehrstündiges Kochen in concentrirter Salzsäure wird sie in Anthranilsäuremethylester gespalten.

Die physiologische Wirkung der Acetylverbindung des Anthranilsäuremethylesters auf den thierischen Organismus ist ebenfalls gering.

Versuch 1. Ein Frosch, 52 g schwer, erhielt 0,1 Acetylanthranilsäuremethylester in Emulsion mit Olivenöl. Nach 45 Minuten machte das Thier in Rückenlage, ohne sich in Bauchlage wälzen zu können, noch leidlich kräftige Schwimmbewegungen, später aber nur noch wenige uncoordinirte Bewegungen. Nach 1½ Stunde lag der Frosch ruhig da,

die Reflexe waren sehr herabgesetzt und nach 4 Stunden nur noch angedeutet. Das Herz arbeitete noch mehrere Stunden normal. Nach 18 Stunden wurde er todt aufgefunden.

Section: Mundhöhle etwas injicirt. Der Magen war angefüllt mit zähem, grünem Schleim, der Darm enthielt ebenfalls etwas grünlichen Schleim. Magen und Mesenterium waren stark injicirt, der Darm sah in Folge der Hyperämie dunkelroth aus. Blutextravasate fanden sich im Verdauungstractus nicht. Auf electrische Reize reagirten die Muskeln und Nerven normal.

Versuch 2. Ein Frosch von 40 g erhielt 0,05 Acetylanthranilsäuremethylester in Emulsion mit Olivenöl. Erst nach 2 Stunden wurde Rückenlage ertragen, und die Reflexe fingen an schwächer zu werden. Nach 18 Stunden waren keine Reflexe mehr auszulösen. Das Herz schlug langsam und schwach. Nach 28 Stunden zeigten sich auf Reize die ersten schwachen Reflexe wieder und wurden im Laufe des Tages noch stärker. Nach 3×24 Stunden hatte der Frosch sich so weit wieder erholt, dass Rückenlage nicht ertragen wurde.

Versuch 3. Ein Frosch, 28,0 g schwer (das Thier schien schon vor dem Versuch etwas matt zu sein), erhielt 0,04 g der Acetylverbindung subcutan. Nach $^3/_4$ Stunde wurde Rückenlage ohne geringste Abwehrbewegungen ertragen. Die Reflexe waren noch gut, erloschen aber schon nach $2^1/_2$ Stunden völlig. Die Herzaction war nach 16 Stunden kaum mehr zu erkennen. Der Tod trat nach ungefähr 70 Stunden ein.

Section: Mundhöhle mässig injicirt, ebenso Mesenterium. Magen und Darm waren stark hyperämisch, ohne dass sich aber Blutextravasate fanden.

Versuch 4. Ein Frosch von 30 g bekam eine Injection von 0,04 g Acetylanthranilsäuremethylester. Nach 1 Stunde war der Frosch noch völlig gesund, konnte sich aber schon nach 2 Stunden nicht mehr in Bauchlage bringen. Die Reflexe waren auch nach $3^3/_4$ Stunden noch normal. In Rückenlage wurden leichte Schwimmbewegungen gemacht. Die Athmung war oberflächlich, aber nicht verlangsamt. Die Reflexe nahmen allmählich ab und erloschen nach 38 Stunden. Der Tod trat nach 4×24 Stunden ein.

Section: Mundhöhle, Magen und Darm leicht injicirt. Der Leber lag eine prallgefüllte Gallengangscyste von 1,4 cm Durchmesser auf, deren Wandung ebenfalls leicht injicirt war.

Versuch 5. Einem Frosch im Gewicht von 31 g wurden 0,02 g der Acetylverbindung eingespritzt. Das Thier fühlte sich nach 45 Minuten etwas matt und ertrug nach $2^1/_2$ Stunden Rückenlage. In derselben führte es einige uncoordinirte Bewegungen aus. Leichte Schwimmbewegungen in Rückenlage wurden nach $3^3/_4$ Stunden gemacht. Zu dieser Zeit wurde die Athmung langsamer und oberflächlicher und nahm nach 21 Stunden wieder normalen Typus an. Die Genesung machte nur langsame Fortschritte. Nach 3×24 Stunden sass er aufrecht da und machte einen gesunden Eindruck, aber in Rückenlage gebracht, konnte er sich trotz aller Anstrengungen noch nicht in Bauchlage bringen. Die Herzaction war während der ganzen Zeit gut geblieben, die Reflexe nicht herabgesetzt.

Versuch 6. Ein Frosch, 27 g schwer, erhielt dieselbe Dosis. Nach 45 Minuten vermochte er sich nur mit Mühe von Rücken- in Bauchlage zu bringen. Die Reflexe waren schon nach 2 Stunden erloschen. Die Herzaction, die zunehmend schwächer wurde, fing nach 18 Stunden an wieder kräftiger zu werden. Ebenso machten sich wieder leichte Reactionen auf Reize bemerkbar. Nach 3×24 Stunden machte der Frosch, wie

derjenige in Versuch 5, in Bauchlage einen gesunden Eindruck. In Rückenlage gebracht, athmete er plötzlich äusserst rasch und ausgiebig. Die Extremitäten, besonders die vorderen, geriethen dabei in leichte klonische und tonische Krämpfe. Völlige Erholung war erst nach 4 × 24 Stunden (nach der Injection) eingetreten.

Versuch 7. Ein 42 g schwerer Frosch erhielt eine Dosis von 0,1 g der Substanz. Während nach $^3/_4$ Stunde die Reflexe erloschen waren, vollführte er einzelne uncoordinirte Bewegungen. Nach 18 Stunden todt aufgefunden.

Versuch 8. Ein Frosch im Gewichte von 63 g erhielt dieselbe Dosis. 45 Minuten später, als er völlig reactionslos dalag, wurden ihm 0,00006 g Strychnin. nitricum injicirt. Die Strychninwirkung machte sich nach 30 Minuten durch leichte Zuckungen auf Reize bemerkbar; zum Tetanus kam es nicht. Als 5 Stunden nach der ersten Injection (also der Acetylverbindung) die Strychninwirkung wieder fast verschwunden war, wurden abermals 0,000025 g Strychnin eingespritzt. Auch nach dieser Injection traten nur Zuckungen, aber kein Tetanus auf. 18 Stunden nach der Einspritzung des Esters wurde der Frosch todt aufgefunden.

Die Wirkung der Acetylverbindung des Anthranilsäuremethylesters ist, wie aus diesen Versuchen hervorgeht, ähnlich derjenigen der Anthranilsäure. Nach wenigen uncoordinirten Bewegungen tritt Lähmung des Centralnervensystems ein, die auch durch grosse Strychnindosen nicht völlig aufgehoben wird. Die letale Dosis, deren Grösse durch Strychnin nicht verändert zu werden scheint, beträgt ungefähr 1,0 g pro Kilo Frosch.

Während der Section der Frösche (Versuch 1, 3 und 4) entströmte den Leichentheilen ein intensiver und penetranter Orangenblüthengeruch. Der Harn derjenigen Frösche, welche die Injection überstanden, besass denselben characteristischen aromatischen Geruch. Aus dem Aether, mit welchem einige Cubiccentimeter Froschharn mehrere Mal ausgeschüttelt werden, liessen sich keine Acetylanthranilsäuremethylester-Krystalle gewinnen. Die Verbindung wird also im Organismus des Frosches vollständig in den Anthranilsäuremethylester gespalten, der seine Anwesenheit durch seinen ihm eigenthümlichen aromatischen Geruch verräth.

Versuch 9 und 10. Auf Kaninchen und Hunde (Mittelgrösse) hatten Dosen von 1,0 g Acetylanthranilsäuremethylester (in Oelemulsion) keinen Einfluss. Zucker und Eiweiss fanden sich nicht im Harn. Ein aromatischer Geruch nach Orangenblüthen war wegen des starken Eigengeruchs der Urine nicht mit Bestimmtheit festzustellen.

Da der Anthranilsäuremethylester als primäre aromatische Base Azofarbstoffe bildet, kann man diese Eigenschaft zum Nachweis benutzen. Der Farbstoff ist von gelbrother Farbe, in Wasser unlöslich, löst sich jedoch in concentrirter Schwefelsäure mit tief violetter Farbe. Die Unlöslichkeit des Farbstoffes in Wasser ermöglicht eine quantitative Bestimmung des Anthranilsäuremethylesters in Lösungen und in ätherischen Oelen. Man titrirt zu diesem Zwecke die diazotirte, auf ein bestimmtes Volumen eingestellte Lösung des Anthranilsäuremethylesters mit einer alkalischen Lösung von β-Naphtol, wobei der entstehende Farbstoff

ausfällt. Durch die Tüpfelprobe lässt sich der Endpunkt der Reaction erkennen.

Es wurden (nach den Angaben von Erdmann, vergl. Berliner Berichte, Jahrgang 35 (1902) pag. 24) 0,5 g β-Naphtol, das durch Krystallisation aus heissem Wasser gereinigt war, in 0,5 ccm Natronlauge und 150 ccm Wasser unter Zusatz von 15 g kohlensaurem Natron gelöst.

Ein Theil des erhaltenen Kaninchenharnes wurde mit Salzsäure angesäuert und mit einer 5 procentigen Nitritlösung bei niederer Temperatur diazotirt. Als nach einigen Minuten freie salpetrige Säure mittels Jodkaliumstärkepapier nachweisbar war, wurde mit diesem Harne ein abgemessenes Quantum der β-Naphtollösung titrirt. Es trat nach wenigen Minuten ein dunkelrother Farbstoff auf, der aber nicht ausfiel, sich vielmehr sofort löste. Es ist leicht möglich, dass die Löslichkeit des Azofarbstoffes durch die Anwesenheit von Ammoniak bedingt war. Erwies sich auch diese Methode zur quantitativen Bestimmung des Anthranilsäuremethylesters in Folge dessen als unbrauchbar, so war doch immerhin der Beweis erbracht, dass die Acetylverbindung nicht als solche wieder ausgeschieden wird, sondern im thierischen Organismus unter Abspaltung der Acetylgruppe in den Methylester übergeht.

Der andere Theil des Kaninchenharnes wurde mit Salzsäure schwach angesäuert, vorsichtig und langsam zur Syrupdicke eingedampft, mit Alkohol extrahirt, der Alkohol wieder verjagt und der Rückstand mit einigen Tropfen concentrirter Salzsäure und etwas Wasser aufgenommen. Nach Zusatz von Alkohol fielen kleine, in der Flüssigkeit glitzernde Krystalle aus. Unter dem Microscop stellten sie sich als lanzettförmige Blättchen dar, von denen die meisten einen fein gesägten Rand besassen. Sobald die Lösung erwärmt wurde, lösten sich die Krystalle wieder. Wahrscheinlich handelte es sich um salzsauren Anthranilsäuremethylester, der aus der wässrigen Lösung nach Zusatz von Alkohol ausfiel. Nachdem der Alkohol und das Wasser nun wieder langsam verdampft waren, blieb eine weisse Masse übrig, die mit schmierigen Bestandtheilen durchsetzt war. Der Schmutz liess sich leicht von dem weissen Salz durch Alkohol trennen. Die Anwesenheit freien Anthranilsäuremethylesters konnte aus leichter blauer Fluorescenz des Alkohols erkannt werden. Der Rückstand wurde in einer dünnen Natronlösung aufgelöst und mit Aether ausgeschüttelt. Der Aether fluorescirte kräftig blau. Nach Verjagung des Aethers blieben keine Krystalle der Acetylverbindung übrig, sondern dem Glase haftete eine dünne ölige Schicht von widerlichem Geruch an. Der geringe Inhalt des Gefässes wurde mit 1 bis 2 ccm verdünnter Salzsäure ausgewaschen, mit Natriumnitrit diazotirt und mit dieser Lösung eine β-Naphtollösung titrirt. Der Azofarbstoff fiel, wie zu erwarten war, jetzt unlöslich aus.

Bei dem Hundeharn fiel die Diazoreaction ebenfalls positiv aus. Aber ebenso wie bei dem Kaninchenharn löste sich der Farbstoff sofort auf. Ein Theil des Harns wurde der Destillation unterworfen. Das Destillat in der Vorlage hatte einen äusserst starken ammoniakalischen Geruch. Da beim Destilliren einer Anthranilsäuremethylesterlösung der Ester mit in die Vorlage übergeht, so musste im Destillat des Hundeharnes der Methylester sich nachweisen lassen. Und in der That trat bei der Diazoprobe wieder derselbe rothe Farbstoff auf, der sich sofort in der Flüssigkeit löste.

Der andere Theil des Hundeharns wurde mit Schwefelsäure angesäuert, auf ein Viertel seines Volumens eingedampft, dann mit Natronlauge wieder stark alkalisch gemacht und mit Aether einige Mal ausgeschüttelt. Der Aether fluorescirte kräftig blau. Krystalle des

Acetylanthranilsäuremethylesters liessen sich aus dem Aether nicht gewinnen, das heisst, die Acetylverbindung war völlig gespalten worden.

Dosen von 1,0 g der Acetylverbindung des Anthranilsäuremethylesters werden also von Kaninchen und Hund ohne jegliche sichtbare oder nachweisbare Störung vertragen. Im thierischen Organismus wird die Acetylgruppe vollständig abgespalten und der Anthranilsäuremethylester lässt sich aus dem Harn nach seiner Isolirung durch Extraction mit Alkohol mittels der Diazoreaction nachweisen.

Auf Bacterien hatte die Acetylverbindung keinen Einfluss, wie die Versuche lehrten, die in derselben Weise angestellt wurden, wie jene mit anthranilsaurem Natron (vergleiche S. 8). Das Wachsthumsvermögen von *Bacterium Coli*, *Staphylococcus albus*, wie *Bacillus subtilis*, war nach einer 48 stündigen Einwirkung einer 0,8 procentigen Lösung der Substanz in keiner Weise beeinträchtigt.

Auf Blutfarbstoff und rothe Blutkörperchen wirkt die Acetylverbindung ebenfalls nicht ein.

Methylanthranilsäuremethylester.

Der Methylanthranilsäuremethylester

$$C_9H_{11}NO_2 = C_6H_4\begin{cases}NH\cdot CH_3\ (1)\\COOCH_3\ (2)\end{cases}$$

ist ein ätherisches Oel von süsslichem, durchdringendem, aromatischem Geruch, der einigermaassen an den Orangengeruch erinnert. Dieser Ester, dessen Schmelzpunkt zwischen 18,5° und 19,5° liegt, kommt regelmässig im Mandarinen-Oel und, wie kürzlich im Laboratorium von Schimmel & Co. festgestellt wurde, auch im Rauten-Oel vor. In Wasser ist er nur wenig, in Alkohol und Aether dagegen in jedem Verhältnis löslich. Seine Lösungen schillern ebenfalls prachtvoll blau. Da er basische Eigenschaften besitzt, bildet er mit Säuren Salze. Das mir zur Verfügung gestellte Präparat war das Sulfat des Methylanthranilsäuremethylesters. Es löst sich leicht in Wasser, wird aber dabei grösstentheils in freie Schwefelsäure und Methylanthranilsäuremethylester zerlegt. In Folge dessen schwimmt das ätherische Oel auf dem fluorescirenden und Lacmuspapier röthenden Wasser. Nach Zusatz von Natronlauge wird auch die an das gelöste Estersalz gebundene Schwefelsäure diesem entzogen und das nun im Wasser fein zerteilte Oel giebt demselben ein milchiges Aussehen.

Gold-, Silber- und Platinlösung werden durch das Estersalz reducirt, aber nicht Kupferlösung. Kaliumchromat und -bichromat werden nur in der sauren Salzlösung reducirt.

Bei Zusatz von Kaliumpermanganat zu einer wässerigen Sulfatlösung tritt zuerst ein gelbgrüner Farbenton auf, der fast augenblicklich in einen tief blauschwarzen überschlägt. Schon nach wenigen Minuten verschwindet auch diese Farbe wieder, um einem zarten hellrothen Ton Platz zu machen. Diese rothe Lösung fluorescirt anfangs intensiv schiefrigschmutzigblau; nach einigen Stunden verschwindet aber diese Erscheinung vollständig. Während allmählich Braunstein ausfällt und sich am Boden absetzt, nimmt die Flüssigkeit eine röthlich braune Nuance an.

Wählt man eine mit Natron neutralisirte oder alkalisch gemachte Sulfatlösung, so tritt nach Zusatz von Kaliumpermanganat nur ein grüner Farbenton auf und nach einigen Stunden fällt unter schmutziger Trübung der Flüssigkeit Braunstein aus.

Mit Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid giebt das Sulfat und folglich der Methylanthranilsäuremethylester einen blauen Niederschlag. Diese Reaction ist so fein, dass noch in $0{,}000000000001 = \frac{1}{10^{12}}$ g des schwefelsauren Salzes der Methylanthranilsäuremethylester nachgewiesen werden konnte.

Bei Zusatz von Quecksilberjodid zu einer Sulfatlösung tritt kein Niederschlag auf. Wohl krystallisiren aber nach längerem Stehen hellgelbe Prismen aus. Die Ecken einzelner derselben sind abgestumpft.

Mit Kalium-Wismut-Jodid giebt das schwefelsaure Salz einen rothen Niederschlag, aus dem sich nach einigen Tagen prachtvolle rothe Prismen ausscheiden.

In saurer und sehr concentrirter Lösung des Salzes fällt nach Zusatz von Phosphorwolframsäure ein weisser, zart violett gefärbter Niederschlag aus.

Setzt man zu einer Sulfatlösung eine concentrirte Jod-Jodkalilösung oder die sogenannte Florence-Lösung, so entsteht ein dicker, brauner Niederschlag; derselbe krystallisirt nach mehreren Stunden zu braunen, spitzen Nadeln aus, die sich in Stern- und Drusenform anordnen. Auch sie geben mit rothem Blutlaugensalz und Eisenchlorid einen blauen Niederschlag.

Die physiologische Wirksamkeit des Methylanthranilsäuremethylesters ist im thierischen Organismus ebenso wie bei den schon besprochenen Substanzen gering.

Zu den folgenden Versuchen wurde stets eine wässerige und genau neutralisirte Lösung des schwefelsauren Salzes gewählt.

Versuch 1. Ein grosser, kräftiger Frosch erhielt eine subcutane Injection von 0,05 g des Salzes. Das Thier wurde allmählich matter, machte nach $1^1/_2$ Stunden anfangs nur schwache und vergebliche Ver-

suche, von Rückenlage in Bauchlage zu kommen, sodann aber — in Rückenlage — kräftige Schwimmbewegungen mit den Hinterfüssen. Die Reflexe waren kaum herabgesetzt, Athmung und Herzaction nicht beeinträchtigt. Nach 4 Stunden stellten sich die ersten Zeichen der Erholung ein.

Versuch 2. Derselbe Frosch erhielt nach 24 Stunden, als er wieder völlig gesund war, 0,075 g. Es wurden die gleichen Wirkungen beobachtet.

Versuch 3. Ein 52 g schwerer Frosch bekam 0,07 g. Schon nach einer Stunde war das Thier sehr matt. Die Reflexe der vorderen Extremitäten erloschen nach 2 Stunden, die der Hinterfüsse waren etwas herabgesetzt. Die Herzaction blieb immer gut. Nach 20 Stunden hatte das Thier sich wieder erholt.

Versuch 4. Ein Frosch im Gewichte von 65 g erhielt 0,075 g. Die nach 1 Stunde auftretende Mattigkeit nahm bis zur dritten Stunde zu. Zu dieser Zeit wurden auch geringe Störungen der Coordination beobachtet. Im übrigen waren die Erscheinungen und der Verlauf derselbe wie in Versuch 1.

Versuch 5. Derselbe Frosch war 2 Stunden nach einer Injection von 0,1 g sehr matt; die Reflexe nahmen mehr und mehr ab, waren nach $2^1/_2$ Stunden nur noch schwach und nach 16 Stunden vollständig erloschen. Erst nach 13 Stunden waren wieder leise Reflexe der Extremitäten durch Reize auszulösen. Die Herzthätigkeit war während der ganzen verflossenen Zeit stets gut und kräftig geblieben. Nach 51 Stunden hatte das Thier sich wieder erholt.

Versuch 6. Ein Frosch, 26 g wiegend, erhielt 0,15 g der Substanz. Das Thier war schon nach 10 Minuten reactionslos, die Herzaction liess sich nicht mehr erkennen. Nach 9 Stunden trat Leichenstarre ein.

Section: Die Haut war normal, die Mundhöhle etwas gerötet, der Magen, welcher dicken, glasigen Schleim enthielt, stark injicirt. Die übrigen Organe waren ohne Besonderheiten. Nerven und Muskeln reagirten auf electrische Reize normal.

Versuch 7. Ein 45 g schwerer Frosch erhielt eine Dosis von 0,2 g. Dem Thiere, das schon nach wenigen Minuten nicht mehr reagirte, wurden nach 15 Minuten 0,00005 g Strychninum nitricum injicirt, welches nur Zuckungen, aber keinen Tetanus hervorrief. Die Herzthätigkeit blieb noch längere Zeit erhalten, allerdings war die Action kaum zu erkennen. Nach 20 Stunden wurde es leichenstarr aufgefunden.

Die Section ergab denselben Befund wie in Versuch 6.

Der Methylanthranilsäuremethylester lähmt bei Fröschen das Centralnervensystem und seine toxische Wirkung wird durch Strychnin nicht wesentlich beeinflusst. Die letale Dosis des schwefelsauren Salzes des Esters beträgt ungefähr 4,0 g pro Kilo Frosch.

Versuch 8 und 9. Dosen von 0,5 g und 1,4 g des schwefelsauren Methylanthranilsäuremethylesters (subcutan) hatten beim Kaninchen keine merkliche Wirkung.

Versuch 10. Ebenso vertrug ein mittlerer Hund 2,1 g sehr gut.

Nur ist zu bemerken, dass sowohl bei dem Hund wie bei dem Kaninchen sich während 24 Stunden nach der Injection leichte katarrhalische Erscheinungen der oberen Luftwege einstellten.

Die Harne des Kaninchens und des Hundes enthielten weder Eiweiss noch Zucker.

Der Harn des Kaninchens, der den aromatischen Geruch des Methylanthranilsäuremethylesters besass, wurde nach Ansäuerung mit Schwefelsäure bis auf ungefähr ein Viertel seines Volumens eingeengt, darauf mit Natronlauge deutlich alkalisch gemacht und mit Aether ausgeschüttelt. Der Aether fluorescirte intensiv blau. Nachdem einige Cubiccentimeter Wasser hinzugegossen waren, wurde der Aether langsam verjagt. Auf dem Wasser blieben zahlreiche, durch Schmiere braunschwarz gefärbte Fetttröpfchen zurück. Die Versuche, die Fetttröpfchen von dem anhaftenden Schmutz zu befreien, missglückten. Mit Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid gaben die Tröpfchen einen kräftigen blauen Niederschlag. Sobald dem Wasser einige Tropfen concentrirter Schwefelsäure hinzugefügt waren, löste sich das Oel im Wasser auf. Bei Gegenwart von Florencelösung fiel ein brauner Niederschlag aus, der sich in drusenförmige Krystalle verwandelte. Eine Lösung von Kaliumpermanganat wurde schnell entfärbt, ohne dass die vorher beschriebenen Farbentöne auftraten.

Der aromatische Geruch nach Methylanthranilsäuremethylester im Kaninchenharn, die Fluorescenz des Aethers, die intensive Berliner-Blau-Reaction der Fetttröpfchen, der Niederschlag und die Krystalle aus der Florencelösung, die schwere Löslichkeit des Oeles in Wasser, die leichte Löslichkeit des Oeles bei Gegenwart von Säuren beweisen, dass es sich nur um Methylanthranilsäuremethylester gehandelt haben kann. Dass das Kaliumpermanganat entfärbt wurde, ohne dass jene Farben auftraten, lag vielleicht an den Verunreinigungen des Esters.

Auch aus dem Hundeharn liessen sich nach der angegebenen Weise die Fetttröpfchen gewinnen. Sie zeigten dasselbe Verhalten.

In dem Froschharn endlich liess sich der Ester mittels Eisen nachweisen. Der Harn wurde mit Aether kräftig ausgeschüttelt. Nach Verjagung des Aethers fiel bei Behandlung des kaum sichtbaren fettigen Rückstandes mit Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid der blaue Farbstoff aus.

Der Methylanthranilsäuremethylester wird demnach von Warmblütern in relativ grossen Dosen ohne Schaden und ohne dass irgendwelche augenscheinliche Störungen im Organismus auftreten, vertragen.

Die Substanz verlässt also als solche wieder den thierischen Organismus. Aber nicht allein durch die Nieren wird der Ester wieder ausgeschieden, sondern auch durch die oberen Luftwege. Zu diesem Schluss berechtigen wenigstens die katarrhalischen Erscheinungen beim Hunde und Kaninchen nach den Injectionen.

Trotz seiner geringen physiologischen Wirksamkeit besitzt der Methylanthranilsäuremethylester bactericide Eigenschaften.

Die Versuche mit dieser Substanz, welche die Feststellung des Grades der Einwirkung auf Bacterien bezweckten, wurden in der Weise angestellt, dass in ein abgemessenes Quantum Peptonwasser, in welches die Bacterien geimpft wurden, 24 Stunden nach der Impfung ein Cubiccentimeter einer bestimmt procentigen wässrigen Lösung des schwefelsauren Methylanthranilsäuremethylesters gethan wurde. Nach-

dem der Ester 24 Stunden eingewirkt hatte, wurden die Mikroorganismen wieder auf alkalischen Pepton-Agar abgeimpft. Die Temperatur des Brutschrankes, in welchem die Bacterien sich befanden, betrug beständig 34°.

Die wässrigen Lösungen des Esters wurden zu jedem Versuch frisch hergestellt, und zwar wurden sowohl saure als auch durch Natron genau neutralisirte Lösungen verwandt, nicht etwa, um die geringe freie Schwefelsäure, die ja keinen Einfluss auf die gewählten Bacterien ausüben konnte, aus dem Wege zu schaffen, sondern weil die Möglichkeit vorhanden war, dass die Wirkung des reinen Methylanthranilsäuremethylesters eine andere als diejenige des an die Schwefelsäure gebundenen Esters wäre.

Die Versuche wurden anfangs mit *Bacterium coli, Staphylococcus albus* und *Bacillus subtilis* angestellt. Da jedoch selbst in 0,15 procentiger Esterlösung das Wachstum des *Bacillus subtilis* nicht gehemmt wurde, so wurden in den späteren Versuchen nur die beiden ersten Mikroorganismen verwandt.

Die Resultate, welche mehrere Male nachgeprüft wurden, veranschaulicht folgende Tabelle.

Bacterium coli.

In saurer Lösung des Methylanthranilsäuremethylestersulfates.		In mit Natron neutralisirter Lösung des Methylanthranilsäuremethylestersulfates.
Nach 24stündigem Einwirken der Lösung auf die Bacterien wurden die Culturen auf alkalischen Pepton-Agar geimpft. 24 Stunden nach dieser Abimpfung waren die Agar-Röhrchen	Der Procentgehalt der einwirkenden Lösung betrug	Nach 24stündigem Einwirken der Lösung auf die Bacterien wurden die Culturen auf alkalischen Pepton-Agar geimpft. 24 Stunden nach dieser Abimpfung waren die Agar-Röhrchen
steril steril steril } und blieben es	0,08% 0,06% 0,05%	steril steril steril } und blieben es
mit 1 bis 4 kleinen Kolonien besetzt	0,04%	mit spärlich gewachsenen Kolonien besetzt
mit spärlich und schlecht gewachsenen Kolonien besetzt	0,03%	mit gut gewachsenen Kolonien besät
mit gut gewachsenen Kolonien besät	0,02%	

Staphylococcus albus.

In saurer Lösung des Methylanthranilsäuremethylestersulfates		In mit Natron neutralisirter Lösung des Methylanthranilsäuremethylestersulfates.
Nach 24stündigem Einwirken der Lösung auf den Coccus wurden die Culturen auf alkalischen Pepton-Agar geimpft. 24 Stunden nach dieser Abimpfung waren die Agar-Röhrchen	Der Procentgehalt der einwirkenden Lösung betrug	Nach 24stündigem Einwirken der Lösung auf den Coccus wurden die Culturen auf alkalischen Pepton-Agar geimpft. 24 Stunden nach dieser Abimpfung waren die Agar-Röhrchen
steril	0,1%	mit kräftig gewachsenen Kolonien übersät
steril	0,08%	„
steril	0,06%	„
mit kräftig gewachsenen Kolonien besetzt	0,05%	„

Die beiden Tabellen weichen im wesentlichen nicht viel von einander ab. Die bactericide Wirkung des Methylanthranilsäuremethylesters innerhalb 24 Stunden macht sich für *Bacterium Coli* schon bei einer 0,05procentigen, für *Staphylococcus albus* bei einer 0,06procentigen Lösung des schwefelsauren Salzes geltend, während die Wirkung derjenigen Lösungen, welche mit Natron neutralisirt sind, geringer ist. Dieser Unterschied in der Wirkung der beiden Lösungen ist bei dem *Bacterium Coli* allerdings nicht gross, jedoch erkennbar, sehr deutlich aber bei dem *Staphylococcus albus*. Um diesen Mikroorganismus in 24 Stunden abzutödten, bedarf es einer 0,06procentigen sauren oder einer 0,15procentigen neutralisirten Lösung. Es hat den Anschein, als ob die freie Schwefelsäure, die in einer solchen Verdünnung wie bei diesen Versuchen das Wachsthum sowohl des *Bacterium Coli* wie des *Staphylococcus albus* nicht beeinträchtigt oder schwächt, eher begünstigt, bei Anwesenheit des Esters die bactericide Wirkung desselben noch verstärkt.

Der Blutfarbstoff und die roten Blutkörperchen werden weder durch den Methylanthranilsäuremethylester noch durch eine neutralisirte Lösung seines Sulfates angegriffen, wohl aber lässt eine saure Sulfatlösung sofort unter Auslaugung der roten Blutkörperchen Methaemoglobin entstehen, eine Wirkung, die natürlich nicht durch den Ester, sondern durch die Schwefelsäure bedingt ist.

Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylester.

Die Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters

$$C_{11}H_{13}NO_3 = C_6H_4 \begin{cases} N \cdot CH_3 \cdot COCH_3 & (1) \\ COOCH_3 & (2) \end{cases}$$

ist eine gelbe, ölige, bitter schmeckende, auf der Zunge etwas beissende Substanz, die bei ungefähr 15° erstarrt. Unverdünnt besitzt dieser Körper einen schwachen, widerlichen Geruch und nimmt erst in stärkerer Verdünnung einen penetranten aromatischen, süsslichen Geruch an, der an den Orangenblüthen-Geruch entfernt erinnert. In Alkohol, Aether und Wasser ist das Oel in jedem Verhältnis löslich. Fluorescenz besitzt die Substanz nicht.

Weder Lösungen von Kupfer noch von Gold, Platin, Silber, Kaliumchromat und Kaliumpermanganat werden durch sie reducirt.

Nach Zusatz von Florence-Lösung zu einer wässerigen Lösung fällt ein brauner Niederschlag aus, der nach mehreren Stunden zu sechseckigen hellbraunen Blättchen und rhombischen Prismen auskrystallisirt. Die Prismen sind bei durchfallendem Lichte zum Theil hellbraun, zum Theil schwarz gefärbt.

Fügt man einer wässerigen Acetylmethylanthranilsäuremethylester-Lösung nach Zusatz von Florence-Lösung Natronlauge hinzu, so löst sich der Niederschlag mit hellgelber Farbe auf und tritt auch nach Zusatz von Salzsäure im Ueberschuss nicht mehr auf. Vielmehr fällt sofort oder bei ungenügender Concentration im Laufe von 24 Stunden ein voluminöser Niederschlag von zarten, spitzen Nadeln aus, die in durchfallendem Lichte von grünlichbrauner, in auffallendem von grünschwarzer Farbe sind. In warmem Wasser und in verdünnter Natronlauge lösen sie sich sofort auf, fallen aber nach Zusatz von Salzsäure wieder aus.

Mit Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid giebt die Acetylverbindung keinen blauen Niederschlag.

Vor kurzem war es der Fabrik gelungen, die anfangs nur in überschmolzenem Zustande erhaltene Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters krystallisirt darzustellen. Das mir zur Verfügung gestellte Präparat dieser Sendung bestand aus kleinen Krystallen, die sich bei geringem Erwärmen zu einem Oele auflösten. Mit Florence-Lösung gaben sie nur dann einen Niederschlag, wenn etwas Salzsäure zugesetzt wurde; dieser krystallisirte aber nicht aus. Nach Zusatz von Natron und Salzsäure fielen die oben erwähnten Krystallnadeln aus.

Zu den folgenden Thierversuchen mit der Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters wurden stets wässerige Lösungen der

ersten Sendung verwandt, soweit aus den Bemerkungen nicht hervorgeht, dass die reine Substanz oder wässerige Lösungen der zweiten Sendung gewählt wurden.

Versuch 1. Ein Frosch, 53 g schwer, erhielt 0,0458 g. Nach 25 Minuten war er ziemlich reactionslos. Die Herzaction blieb gut. Nach 18 Stunden wurde er völlig gesund wieder aufgefunden.

Versuch 2. Ein Frosch im Gewichte von 60 g erhielt 0,06 g. Die Reflexe waren nach 30 Minuten nur schwach. Völlige Reactionslosigkeit konnte nach 4 Stunden festgestellt werden; das Herz arbeitete jedoch kräftig. Nach 24 Stunden hatte das Thier sich wieder ziemlich erholt.

Versuch 3. Ein Frosch, 60 g wiegend, ertrug schon 15 Minuten nach einer Injection von 0,09 g Rückenlage, die Reflexe waren nur schwach angedeutet und schwanden bald vollständig. Die Herzaction wurde allmählich schwächer und war in der Folgezeit nur schwer zu erkennen. Die ersten geringen Reflexe liessen sich nach 3 × 24 Stunden wieder auslösen, nahmen im Laufe des vierten Tages an Stärke etwas zu, waren aber nach 104 Stunden (nach der Injection) wieder erloschen. Am Bauch, besonders aber an der Unterseite des Halses und des Maules, ebenso an der Axillar- und Inguinalgegend und der Unterfläche der Oberschenkel schossen am dritten Tage einige mohnkorn- bis hirsekorngrosse röthlichgelb gefärbte Wärzchen hervor. Nach 5 × 24 Stunden wurde der Frosch todt, aber nicht leichenstarr aufgefunden.

Section: Bauchhaut, Magen und Darm waren stark injicirt. Die Injection des Darmes nahm nach der Cloake zu etwas ab.

Ein Teil der Haut, auf der die Warzen sassen, wurde nach der Härtung in Paraffin gebettet und gefärbt. Unter dem Microscop fand sich an den Stellen, an welchen die Warzen sassen, die Epithelschicht abgehoben. Der Inhalt dieser Bläschen bestand aus einigen abgelösten, zum Theil schon kernlosen Epithelzellen und etwas Detritus. Auch an einzelnen Hautstellen, denen äusserlich makroscopisch noch keine Veränderung anzusehen war, war das Epithel schon abgehoben.

Versuch 4. Ein mittlerer Frosch erhielt dieselbe Dosis. Nach 1 Stunde war das Thier völlig reactionslos. Der Tod trat nach ungefähr 36 Stunden ein.

Die Section ergab denselben Befund wie in Versuch 3. Nur war die Bauchhaut nicht hyperämisch.

Versuch 5. Ein Mittelfrosch erhielt 0,1 g. Nach $^1/_2$ Stunde war das Thier völlig reactionslos, die Herzthätigkeit geschwächt und verlangsamt. Nach 24 Stunden wurde er todt aufgefunden.

Section: Der Darm zeigte allgemeine, an einzelnen circumscripten Stellen besonders stark ausgeprägte Hyperämie. Der ebenfalls stark injicirte Magen enthielt blutigen Schleim. Die Haut wies keine Besonderheiten auf.

Bei Injectionen mit unverdünnter Substanz trat die Wirkung schon nach wenigen Minuten ein.

Versuch 6. Ein Frosch im Gewichte von 25 g bekam eine Injection von 0,14 g des Acetylmethylanthranilsäuremethylesters, welches ich bei der zweiten Sendung erhalten hatte. Nach 10 Minuten war das Thier reactionslos. Electrische Reize liessen Muskeln und Nerven normal reagiren. Die Herzaction war langsam und klein. Nach 15 Minuten wurden dem Thiere 0,00005 g Strychninum nitricum eingespritzt, das keine Krämpfe, sondern nur leichte Zuckungen auf Reize hervorrief. Nach 20 Stunden wurde der Frosch leichenstarr aufgefunden.

Section: Die Haut war normal, die Mundhöhle leicht geröthet, Magen und Darm stark hyperämisch. Letzterer enthielt ausser Koth blutigen Schleim.

Merkwürdig muss erscheinen, dass weder bei geringeren, noch gleichen, noch stärkeren Dosen wie in Versuch 3 bei anderen Fröschen eine Bläschenbildung auf der Haut auftrat, dass die Bauchhaut der anderen Thiere sogar nicht einmal hyperämisch war. Die Annahme der Möglichkeit, dass infolge Ausscheidung der Substanz durch Haut eine Reizung derselben durch das ätherische Oel mit folgender Blasenbildung statt hatte, war anfangs nicht ganz ungerechtfertigt, musste aber wieder von der Hand gewiesen werden, als sich später herausstellte, dass im Froschkörper die Acetylgruppe abgespalten und nur der Methylanthranilsäuremethylester ausgeschieden wird. Gleiche Wirkungen auf die Haut wurden aber bei dem Methylanthranilsäuremethylester nicht beobachtet (vergl. S. 14 u. f.).

Ich glaube auch nicht, dass die Acetylverbindung allein auf der Haut solche immerhin starken Veränderungen hervorzubringen vermag, ohne im Organismus besonders auf Darm und Magen in analoger und gleich starker Weise zu wirken. Das Auftreten der Bläschen auf der Bauchseite lässt eher auf eine äussere locale Ursache schliessen.

Der Frosch überlebte den einen (Versuch 4), der eine gleiche Dosis von 0,09 g empfangen hatte, um $3^1/_2$ Tag, den anderen (Versuch 5), der 0,1 g erhalten hatte, um 4 Tage. Die Wirkung war also eine bedeutend schwächere. Wahrscheinlich waren kurz nach der Injection aus dem Stichkanal einige Tropfen der Acetylverbindung wieder herausgeflossen und konnten, da der Teller, auf dem der Frosch lag, nicht sehr feucht gehalten wurde, auf der Bauchseite des Thieres eine ätzende Wirkung ausüben.

Die Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters lähmt ebenso wie die schon besprochenen Substanzen das Centralnervensystem der Frösche; aber diese toxische Wirkung tritt relativ schnell, jedenfalls bedeutend früher wie bei jenen Substanzen ein. Ebenfalls lässt Strychnin nach Vergiftung mit der Acetylverbindung die erloschenen Reflexe zwar wieder etwas aufflackern, besitzt aber im übrigen keine antidotarische Wirkung. Die letale Dosis der Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters beträgt 1,5 g pro Kilo Frosch.

Bevor ich auf die Untersuchung des Froschharnes eingehe, mögen erst die Versuche mit dieser Acetylverbindung an Warmblütern abgehandelt werden.

Versuch 6. Ein Meerschweinchen, 500 g schwer, erhielt 0,55 g subcutan. Nach wenigen Minuten machte es atactische Bewegungen, fiel auf die Seite und schlief ein. Die Reflexe der Hinterbeine waren bedeutend herabgesetzt und erloschen nach 3 Stunden völlig, die der vor-

deren Extremitäten blieben noch längere Zeit angedeutet. Zuweilen machte das Thier in Rückenlage spontan langsame Gehbewegungen mit den Vorderbeinen; ferner traten an den Hinterbeinen kurze und nur je einmalige Zuckungen in Zwischenräumen von 1 Minute bis 15 Minuten auf. Die Athmung wurde allmählich langsamer und sehr oberflächlich, ebenso nahm die Frequenz der Herzschläge ab, während die Energie der Herzcontractionen, soweit sie nach dem Spitzenstoss beurtheilt werden kann, noch normal blieb. Nach $5^1/_2$ Stunden erlosch auch der Cornealreflex. Während der Somnolenz liessen sich aus der Blase ungefähr 2 ccm alkalischen, milchigen Urins drücken. Das Thier wurde nach 19 Stunden leichenstarr aufgefunden.

Section: An der Injectionsstelle war ein sulziges Oedem aufgetreten. Hyperämien liessen sich an keinem Organ feststellen. Der Darm war mässig angefüllt mit geformten Kotballen. Nieren, Leber, Lunge und Herz zeigten keine Besonderheiten.

Versuch 7. Ein kleines Kaninchen erhielt 0,5 ccm der unverdünnten Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters subcutan. Es machte nach wenigen Minuten uncoordinirte Bewegungen, fiel dann um und schlief ein. Die Reactionsfähigkeit der Hinterbeine war sehr herabgesetzt. Athmung und Herzschlag waren weder verlangsamt noch abgeschwächt. Nach halbstündigem Liegen wälzte es sich einige Male herum, als ob es erwachen wollte. Im Laufe von 5 Stunden hatte es sich wieder völlig erholt, so dass es frass.

Versuch 8. Ein ausgewachsenes mittleres Kaninchen erhielt 0,55 g subcutan. Das Thier wurde bald matt und sass nach einer halben Stunde ruhig da. In Rückenlage gebracht, richtete es sich nur langsam wieder auf die Füsse. Die Reflexe, die Athmung und der Herzschlag waren nicht herabgesetzt. Nach 3 Stunden hatte es sich ziemlich erholt.

Das Kaninchen starb 5 Wochen später plötzlich. Der Befund der inneren Organe war ein normaler mit Ausnahme des Magens. An dem Pylorus fanden sich nämlich mehrere stecknadelknopf- bis linsengrosse Ulcera von schwarzbrauner Farbe. Ein Stück des Magens wurde in Paraffin gebettet und gefärbt. Unter dem Microscope fand sich, dass die Geschwüre nicht in die Submucosa drangen, sondern dass nur die Mucosa ulcerirt war. Merkwürdiger Weise liess sich Blut oder Blutpigment an den Querschnitten mikroscopisch nicht wahrnehmen.

Dass die Ulcera mit dem plötzlichen Tode des Thieres in Verbindung stehen, darf wohl angenommen werden, aber zweifelhaft ist, ob ein Zusammenhang zwischen der Injection der Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters und den Geschwüren im Magen besteht.

Versuch 9. Ein Hündchen von etwa 5 kg erhielt 1 ccm der reinen unverdünnten Substanz subcutan. Es blieb gesund.

Versuch 10 und 11. Derselbe Hund blieb nach Injection von 1,2 g der Substanz in Verdünnung und 1,8 ccm der unverdünnten Substanz gesund.

Sämtliche Harne gaben mit Florence-Lösung einen braunen Niederschlag, der aber nicht auskrystallisirte. Nach Zusatz von Natronlauge und Salzsäure im Ueberschuss fielen niemals, weder gleich, noch später, die characteristischen Nadeln aus.

Der Harn des Meerschweinchens, der einen aromatischen Geruch hatte, wurde mehrere Mal mit Florence-Lösung versetzt und jedes Mal mit Aether, in dem sich der Niederschlag löste, ausgeschüttelt. Nachdem der Aether verjagt war, wurde der Rückstand über dem Wasserbade so lange erwärmt, bis kein Jod mehr sublimirte, und dann mit etwas Wasser aufgenommen. Nach 1 Woche fanden sich einige auskrystallisirte Drusen,

die mit Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid einen blauen Niederschlag gaben. Dieselben glichen den auf S. 14 erwähnten Krystallen.

Der Harn der beiden Kaninchen hatte einen starken Eigengeruch, war frei vom Eiweiss, besass aber für Kupfersulfat nach Zusatz von Natronlauge ein sehr starkes Reductionsvermögen schon bei geringem Erwärmen. Es bildete sich zunächst hellgelbes Oxydulhydrat, dann rothes Kupferoxydul. Auch Silber- und Goldsalze wurden reducirt.

Da die Anwesenheit von Zucker vermutet wurde, wurde ein Theil des Harnes desjenigen Kaninchens, welches 0,55 g der Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylester (vergl. Versuch 8) erhielt, mit Hefe vergohren. Die Zuckerprobe fiel positiv aus und zwar fanden sich 0,6 Procent Zucker.

Der übrige Harn wurde in derselben Weise behandelt, wie der des Meerschweinchens. Nach 1 Woche fanden sich auf dem Boden des Gefässes kleine Warzen, Drusen und büschelförmige Krystalle.

Der Harn des anderen Kaninchens wurde mit so viel Schwefelsäure versetzt, bis er deutlich sauer reagirte, zur Syrupdicke eingedampft, wieder alkalisch gemacht und mit Aether extrahirt. Der ätherische Auszug fluorescirte blau. Nach Zusatz von einigen Cubiccentimeter Wasser wurde der Aether wieder verjagt, auf dem Wasser schwammen einige gelblich gefärbte Fettperlen. Eine von diesen wurde mit einem Spatel herausgefischt, der Spatel rings um das Fetttröpfchen sauber gereinigt und dasselbe darauf in eine Lösung von Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid gethan. Es trat intensive Blaufärbung der Lösung ein. Die übrigen Perlen gaben nach Fällung mit Florence-Lösung schöne büschelförmige Krystalle.

Der Harn der Hunde enthielt weder Eiweiss noch Zucker. Der ätherische Auszug des anfangs mit Schwefelsäure angesäuerten, nach der Einengung mit Natronlauge wieder alkalisch gemachten Harnes fluorescirte ebenfalls aber nur schwach blau. Nach Verjagung des Aethers schwammen auf dem hinzugegossenen Wasser nur wenige kleine Fetttröpfchen, die mit Eisen einen kräftigen blauen Niederschlag gaben.

Versuch 12. Ein mittleres Kaninchen erhielt eine subcutane Injection von 1,0 g einer Lösung des Acetylmethylanthranilsäuremethylesters, welchen ich bei der zweiten Sendung erhalten hatte. Das Thier wurde nach einer halben Stunde schläfrig und streckte die Vorderfüsse von sich. In Rückenlage gebracht, wälzte es sich nur mit Mühe und schwerfällig auf den Bauch. Herzschlag, Athmung und Reflexe blieben normal. Nach vier Stunden hatte das Thier sich einigermaassen wieder erholt.

Der Harn, welcher in 18 Stunden abgesondert war, reagirte alkalisch, enthielt kein Eiweiss, reducirte Kupferlösung und gab eine positive Phenylglycosazonprobe. Mittels der Gährprobe liess sich feststellen, dass er 1,1 Procent Zucker enthielt. Der Harn wurde nun mit Schwefelsäure angesäuert, fast bis zur Trockene langsam eingedampft, mit Natron wieder alkalisch gemacht und mit Alkohol extrahirt. Nach Verjagung des Alkohols wurde der Rückstand mit Aether ausgezogen. Der Aether fluorescirte intensiv blau. Nachdem der Aether nach Zusatz von etwas Wasser wieder verjagt war, schwammen auf letzterem zahlreiche kleine und kleinste Fetttröpfchen, die alle Reactionen des Methylanthranilsäuremethylesters gaben.

Versuch 13. Ein mittlerer Hund erhielt 3,0 g der Substanz von der zweiten Sendung in Lösung subcutan. Erscheinungen rief diese Dosis nicht hervor. Die 18stündige Menge des Harnes betrug nur 30 ccm. Er reagirte alkalisch und enthielt weder Eiweiss noch Zucker. Der Harn wurde in derselben Weise behandelt wie beim vorigen Versuch. Fluo-

rescenz des Aethers war nicht mit Sicherheit zu erkennen. Nach Verjagung des Aethers schwammen auf dem hinzugegossenen Wasser keine Fettperlen. Diese Flüssigkeit gab zwar mit Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid einen intensiven blauen Niederschlag, die Reduction von Metallsalzen war aber nur schwach.

Der Harn endlich der Frösche, welche eine Injection der Acetylverbindung erhalten hatten, gab mit Florence-Lösung einen Niederschlag, aus dem aber nach Zusatz von Natron und Salzsäure keine Krystallnadeln ausfielen, ein Beweis, dass die Acetylverbindung im Harne nicht zugegen war.

Da die Anwesenheit von Methylanthranilsäuremethylester vermuthet wurde, wurde der geringe Rückstand eines ätherischen Auszuges aus dem vorsichtig eingedampften Harn mit Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid behandelt; ein kräftiger blauer Niederschlag bestätigte die Vermuthung.

Wie die Versuche an Warmblütern zeigen, scheint die Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters für den Organismus des Hundes ziemlich indifferent zu sein, da selbst Dosen von 3,0 g von einem mittleren Thiere ohne die geringsten nachweisbaren Schädigungen der Organe und ohne allgemeine Störungen vertragen werden; auch die Fresslust ist nicht herabgesetzt. Vom Organismus wird kein Zucker ausgeschieden.

Anders liegen die Verhältnisse beim Meerschweinchen und beim Kaninchen. Nach Einführung von mässigen Dosen ruft die Substanz bei diesen Thieren anfänglich leichte Störungen der Coordination hervor, bald aber werden die Thiere benommen. Die Wirkung als Narcoticum ist jedoch nicht von langer Dauer. Nach stärkeren Dosen wird das Centralnervensystem gelähmt. Für Meerschweinchen beträgt die letale Dosis 1,0 g pro Kilo. Ausser diesen nervösen Erscheinungen bewirkt die Substanz bei Kaninchen eine beträchtliche Ausscheidung von Zucker, der sich leicht durch die Gähr- und Phenylglycosazonprobe nachweisen lässt.

Die Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters ist im Organismus der Frösche, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunde nicht haltbar, sondern wird nach Abspaltung der Acetylgruppe als Methylanthranilsäuremethylester ausgeschieden.

Auf Microorganismen hat die Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters keinen Einfluss. Das Wachstum des *Bacterium coli*, *Staphylococcus albus* und *Bacillus subtilis* — die Culturen waren in ungefähr 4 ccm Pepton-Wasser geimpft — wurde nach Zusatz von 1 ccm einer 3 procentigen Lösung bei einer Einwirkung von 3 Tagen in keiner Weise gestört.

Es fragte sich nun, ob andererseits die Bacterien auf die Substanz irgend eine Wirkung ausgeübt hatten, welche gemäss der Zusammensetzung der Substanz und gemäss der Resultate der Thierversuche natürlich nur in einer Abspaltung der Acetylgruppe bestehen konnte.

Nachdem die Bacterien 4 Tage lang mit der Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters in Berührung gewesen waren, wurden die Culturen in folgender Weise untersucht.

Cultur des Bacterium Coli.

1. Zu einem Theil Peptonwasser wurden nach Ansäuerung mit einem Tropfen verdünnter Schwefelsäure einige Tropfen einer Kaliumpermanganatlösung gethan. Sie wurde zwar sofort entfärbt, ohne dass aber die verschiedenen Farben, wie sie bei der Lösung des reinen Sulfats des Methylanthranilsäuremethylesters beobachtet wurden, auftraten. Auch liess sich keine schmutzigblaue Fluorescenz des Peptonwassers erkennen.

2. Zu einem Theil Peptonwasser wurde etwas Florencelösung gethan. Zwar trat ein kräftiger Niederschlag auf, aber Krystalle bildeten sich auch nach wochenlangem Stehen nicht aus.

3. Ein Theil wurde langsam eingedampft, mit Aether extrahirt und der Aether wieder verjagt. Der Rückstand aus demselben gab mit Kalium Ferricyanatum und Eisenchlorid einen nur sehr geringen blauen Niederschlag.

Zur Kontrolle wurden ungefähr 4 ccm Peptonwasser, die ebenfalls mit Bacterium coli beschickt waren, ohne dass aber etwas der Acetylverbindung hinzugethan war, zur Trockene eingedampft und mit Aether extrahirt. Der Rückstand desselben gab ebenfalls einen nur geringen blauen Niederschlag.

Cultur des Staphylococcus albus.

Die Untersuchung wurde in derselben Weise angestellt wie bei dem Bacterium coli und zeitigte dasselbe Resultat.

Cultur des Bacillus subtilis.

1. Ein Theil des Peptonwassers entfärbte nach Ansäuerung eine Kaliumpermanganatlösung. Das Farbenspiel trat ebenfalls nicht auf, wohl konnte aber eine allerdings nur sehr leichte schmutzigblaue Fluorescenz festgestellt werden.

Krystalle aus dem Niederschlag, der nach Zusatz von Florencelösung ausfiel, bildeten sich ebenfalls nicht aus.

3. Der Rückstand des ätherischen Extractes des Peptonwassers gab mit Eisen einen kräftigen blauen Niederschlag. Aber einen ebenso kräftigen Niederschlag gab auch eine reine Peptonwassercultur des Bacillus subtilis.

Das *Bacterium Coli* und der *Staphylococcus albus* haben also keinen Einfluss auf die Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters. Dieses Resultat musste für diese beiden Microorganismen auch erwartet werden; denn wäre auch nur von dem zwölften Theil der Substanz die Acetyl-

gruppe abgespalten, so wären die Microorganismen abgetödtet worden. Die geringe Blau-Reaction beweist jedenfalls noch nicht die Gegenwart freien Methylanthranilsäuremethylesters.

Der *Bacillus subtilis*, der sich gegen freien Methylanthranilsäuremethylester ja ziemlich indifferent verhält (vergl. S. 17), scheint im Gegensatz zu den beiden anderen die Acetylgruppe zum geringen Theil abzuspalten. Die leichte schmutzigblaue Fluorescenz des Peptonwassers nach Zusatz von Kaliumpermanganat berechtigt wenigstens zu diesem Schlusse.

Weder Blutkörperchen noch Blutfarbstoff erleiden durch die Acetylverbindung des Methylanthranilsäuremethylesters eine Veränderung.

Piperonal.

Von den sechs möglichen Dioxybenzaldehyden $C_6H_3(OH)_2 \cdot CHO$, von denen drei Isomere mittels der Chloroformreaction aus den drei Dioxybenzolen (Pyrocatechin, Resorcin und Hydrochinon) erhalten worden sind [$H_2O + CHCl_3 + C_6H_4(OH)_2 = C_6H_3(OH)_2COH + 3HCl$], ist der Protocatechualdehyd bemerkenswerth, da er die Stammsubstanz des neuerdings wichtigen Piperonals und Vanillins ist.

Piperonal, auch Heliotropin genannt,

$$C_8H_6O_3 = C_6H_3\begin{cases}O\\O\\CHO\end{cases}>CH_2$$

ist der Methylenäther des Protocatechualdehyds. Es findet sich regelmässig im Spiräaöl, d. h. dem ätherischen Oel von Spiräa Ulmaria, und in manchen Vanillesorten.

Fabrikmässig dargestellt wird das Piperonal durch Behandlung von Piperinsäure oder — und jetzt wohl fast ausschliesslich — von Safrol und Isosafrol mit Oxydationsmitteln. Es bildet zolllange, glänzende Krystalle (aus Wasser), ist löslich in 500 bis 600 Teilen kalten Wassers, leicht in Alkohol, in jedem Verhältnis in Aether und heissem Alkohol. Der Schmelzpunkt liegt bei 37°, der Siedepunkt bei 263°. Im allgemeinen verhält es sich wie Benzaldehyd. Bemerkenswerth ist, dass es die charakteristischen Reductionen der Salze von Kupfer, Gold u. s. w. durch Aldehyde nicht giebt. Durch Oxydation bildet es die ihm entsprechende Piperonylsäure.

Das Piperonal spielt in der Parfumindustrie eine grosse Rolle. Es besitzt einen penetranten, cumarinähnlichen Geruch, der sehr an

das wirkliche Parfum der Heliotropblume erinnert. Es wird zu Extraits, Sachets und Seifen verarbeitet. In der Sonne nehmen die Krystalle eine gelblichbraune Farbe an und verlieren das Parfum vollständig.

Nach den Versuchen von Dr. Ricardo Frignani (vergl. New York Medical Record) besitzt Heliotropin antipyretische wie antiseptische Eigenschaften. Die erstere ist nicht sehr energisch, aber in vielen Fällen genügend. Es wird am besten in Dosen von 15 grains (1 grain = 0,008 g) 3—4 mal täglich gegeben. Aber auch grössere Dosen werden ganz gut vertragen. Seine antiseptische Wirkung ist kräftiger, und da es unschädlich selbst in Dosen von $^1/_2$ bis 1 Drachme ist, soll es einen hohen Rang unter derartigen Mitteln verdienen.

Nach O. Wimmer „Weitere experimentelle Untersuchungen über das Piperonal. Ing. Diss. (Liebreich) Berlin“ hemmt das Piperonal die Pepsin-, Pankreaswirkung, Milchsäuregährung, Fäulnis, aber nicht die Hefewirkung. Es setzt die Temperatur normaler und fiebernder Thiere (auch klinische Beobachtung) herab.

Genauere Untersuchungen über das Verhalten des Piperonals im Thierkörper sind von Dr. A. Heffter angestellt. Piperonal ging im Organismus des Kaninchens — es wurden 4,0 g injicirt — in die zugehörige Piperonylsäure über, die aus dem alkoholischen Harnextracte durch Salzsäure gefällt werden konnte. Auffallend war, dass hier keine Paarung mit Glycocoll stattgefunden hatte, während dies doch bei allen aromatischen Monocarbonsäuren, wenn sie nicht mehr als eine Hydroxylgruppe enthalten, der Fall ist. Verfasser nahm daher selbst 5,0 g Piperonylsäure ein und erhielt aus dem Harne zweierlei Säuren, wovon die eine unveränderte Piperonylsäure, die andere aber Piperonylursäure $C_6H_3(O_2CH_2)CONHCH_2 \cdot COOH$ war. Diese bildet farblose, glänzende, breite Prismen vom Schmelzpunkt 178°, ist in kaltem Wasser schwer, in heissem und in Alkohol leicht löslich, und wird durch Kochen mit Salzsäure in ihre Componenten gespalten, deren eine als Piperonylsäure erkannt wurde. Dr. Heffter fügt in einer Anmerkung hinzu: „Wie dieser und einige andere Versuche lehrten, ist das Piperonal physiologisch ganz unwirksam. Dass es auch für den Menschen unschädlich ist, geht aus folgenden Mitteilungen hervor, die ich einem befreundeten Arzte verdanke. Ein Chemiker nahm zu Selbstmordzwecken 50 ccm einer koncentrirten alcoholischen Piperonallösung zu sich, also ungefähr 10 g. Sein Befinden wurde in keiner Weise dadurch verändert.“

Ein chemischer Körper kann nun im thierischen Körper allerdings fast gänzlich indifferent sein und braucht eine giftige oder pharmacodynamisch verwerthbare Wirkung in selbst grossen Dosen nicht zu zeigen. Die im Organismus gesetzten chemischen Veränderungen können sehr gering sein und qualitativ und quantitativ so wenig ausserhalb der

Norm liegen, dass functionelle Störungen gar nicht auftreten. Anderseits aber reagirt jedes Thier verschieden stark und verschiedenartig auf ein Gift nach Maassgabe seiner chemischen Organisation. Bei Hunden und Kaninchen konnte ich allerdings selbst bei Dosen von 5,0 g beziehungsweise 4,0 g keine Folgeerscheinungen beobachten. 8,0 g Piperonal, die ich einem mittleren Hund per os eingeführt hatte, verursachten starke Magenbeschwerden, so dass nach $1^1/_2$ Stunden unter heftigem Würgen Erbrechen eintrat, wodurch wohl fast die ganze Menge der eingeführten Substanz wieder aus dem Magen befördert wurde.

Die Versuche jedoch, die an Fröschen angestellt wurden, zeitigten überraschende Resultate.

Versuch 1. Zwei Frösche im Gewichte von 30 g und 31 g erhielten je 0,08 g Piperonal in Emulsion mit Gummi arabicum in den Rückenlymphsack injicirt. Fast momentan trat Lähmung ein: die vorderen Extremitäten antworteten auf mechanische Reize wenig, während die Reflexe der hinteren Extremitäten erloschen waren. Athmung wurde ebenso wie die Herzaction schwächer und hörte nach einer halben Stunde auf. Die Section ergab, dass die Emulsion vollständig resorbirt war. Muskeln und Nerven reagirten auf electrische Reize normal. Das Erlöschen der Reflexe musste also auf Lähmung des Centralnervensystems beruhen, während viele Stoffe aus der Gruppe der ätherischen Oele eine die Nerven peripher lähmende Wirkung in der Weise des Curare ausüben.

Versuch 2. Zwei Frösche, 30 g und 32 g wiegend, erhielten je 0,04 g Piperonal in Emulsion mit Gummi arabicum; es traten schon nach wenigen Minuten Lähmungen ein, so dass Rückenlage ertragen wurde. Nach 24 Stunden hatten sich die Thiere wieder vollständig erholt.

Eine Injection von 0,05 g Piperonal machte gleiche Erscheinungen.

Versuch 3. Zwei Frösche erhielten je 0,075 g Piperonal in Emulsion. Wiederum trat sehr schnell Lähmung der Extremitäten ein; die Reflexe waren äusserst schwach. Einer von ihnen, 31 g wiegend, starb nach 5 Stunden, der andere mit einem Gewicht von 40,5 g überstand.

Versuch 4. Zwei Frösche, 39 g und 41 g schwer, erhielten je 0,1 g Piperonal in Emulsion. Die Krankheitserscheinungen waren dieselben wie vorher. Beide Frösche erholten sich wieder.

Versuch 5. Zwei Frösche im Gewichte von 41 g und 47 g erhielten je 0,12 g Piperonal. Beide Thiere erkrankten schwer und fingen erst nach 12 Stunden an sich zu erholen.

Das Piperonal lähmt also bei Fröschen das Centralnervensystem und zwar tritt die Wirkung bei subcutanen Injectionen äusserst schnell ein. Die letale Dosis beträgt ungefähr 2,5 g pro Kilo Frosch.

Werden durch Piperonal bei Fröschen besonders die Centren des Nervensystems gelähmt, so muss durch Mittel, die diese Centren reizen, das durch Piperonal erzeugte Krankheitsbild abgeschwächt, vielleicht sogar zum Verschwinden gebracht werden.

Versuch 6. Ein kleiner Frosch erhielt die für ihn fast doppelt tödtliche Dosis von 0,17 g Piperonal. Da das im Gummi arabium emulgirte Piperonal trotz feinster Zerkleinerung häufig die kleinen Canülen der Spritzen verstopfte, so wurden bei den beiden folgenden Versuchen Oel-

emulsionen angewandt. Das Oel wurde auf 38° bis 40° erhitzt, dann tüchtig umgeschüttelt und schnell auf Zimmertemperatur abgekühlt. Das im Oele suspendirte Piperonal blieb selbst bei dieser niederen Temperatur einige Minuten im Oele geschmolzen. Allerdings fing das Piperonal im Froschkörper erst nach 20 Minuten an zu wirken und erst nach $1^1/_2$ Stunden waren die Reflexe fast völlig erloschen. Zuweilen liessen sich ganz leichte Zuckungen wahrnehmen, die zu gleicher Zeit an allen Extremitäten auftraten. Nach Verlauf von einer Stunde wurden 0,00005 g Strychninum nitricum injicirt. Eine Stunde nach der Strychnin-Injection zeigten sich auf Reize die ersten leichten Zuckungen, die nach 2 Stunden ihr Intensitätsmaximum erreichten. Krämpfe oder Tetanus traten nicht auf. — Ein Kontrollfrosch erhielt nur 0,00005 g Strychninum nitricum. Nach $1^1/_2$ Stunden lag er im heftigsten Tetanus. — Nach 20 Stunden war der Frosch nur noch wenig krank, aber noch so matt, dass Rückenlage ertragen wurde. Völlige Erholung war erst nach 30 Stunden eingetreten.

Versuch 7. Ein kleiner Frosch erhielt 0,00005 g Strychninum nitricum. Nach $1^1/_4$ Stunden, als er im heftigsten Tetanus lag, wurden 0,16 g Piperonal in Oel injicirt. Eine Stunde nach der Injection waren nur noch leichte Krämpfe, aber kein Tetanus mehr auszulösen. Auch diese Krämpfe gingen im Verlauf einer Stunde in leichte Zuckungen über. Ebenso wie der andere Frosch, der zuerst die Piperonal- und dann die Strychnininjection erhalten hatte, war er nach 20 Stunden noch etwas matt und hatte sich nach 30 Stunden völlig erholt.

Das Strychnin ist also für Frösche ein Mittel, welches die lähmende Wirkung des Piperonals, selbst wenn es in doppelt tödtlicher Dosis eingegeben wird, vollständig aufhebt. Andrerseits ist das Piperonal ein vorzügliches Antidot gegen Strychninvergiftung.

Um zu erfahren, als was das Piperonal aus dem Froschkörper ausgeschieden wird, wurde der Harn mehrerer Frösche, welche eine Piperonalinjection erhalten hatten, gesammelt. Der Harn, der keinen aromatischen Geruch besass, wurde langsam fast bis zur Trockenheit verdampft, nach Ansäuerung mit Salzsäure mit Alkohol extrahirt und der Alkohol wieder verjagt. Als Rückstand blieben kleine Krystalle übrig, die in kaltem Wasser unlöslich, in Alkohol und Aether leicht löslich waren. Diese Eigenschaften, ferner der Schmelzpunkt und die Fähigkeit zu sublimiren bewiesen, dass es sich um Piperonylsäure handelte. Der Schmelzpunkt lag allerdings bei 223°, also 4° tiefer als derjenige der reinen Piperonylsäure. Dieser kleine Fehler ist aber von keiner weiteren Bedeutung, da schon geringe Verunreinigungen den Schmelzpunkt um viele Grade herunterdrücken. Der Rest der Piperonylsäure wurde durch Sublimation abermals gereinigt, erwies sich aber als zu gering zur Schmelzpunktbestimmung.

Also ebenso wie im Organismus des Kaninchens und Hundes geht das Piperonal im Froschkörper in die zugehörige Piperonylsäure über und lässt sich durch seine Fähigkeit, zu sublimiren, und durch die Schmelzpunktbestimmung als solche erkennen. Piperonylursäure findet sich im Froschharn nicht.

Zum Schlusse möchte ich nicht unterlassen, nochmals Herrn Professor Dr. Rudolf Kobert meinen Dank auszusprechen für die freundliche Überlassung der Substanzen, wie auch für das mir zu den Versuchen zur Verfügung gestellte Material.

Ebenso spreche ich Herrn Professor Dr. Albert Thierfelder meinen besten Dank dafür aus, dass er mir gestattete, im bacteriologischen Institut die notwendigen Versuche vorzunehmen, und Herrn Dr. Hoffmann, Assistent am pharmacologischen Institut, für die gütige Unterstützung bei den Untersuchungen.

Litteratur-Verzeichniss.

Beilstein, Organische Chemie, 3. Auflage.
Schmidt, Pharmaceutische Chemie 1896.
Ladenburg, Prof. Dr., Handwörterbuch der Chemie 1882, Bd. I S. 208.
Schimmel & Co., Berichte.
Jahresbericht über Fortschritte der Thierchemie 1895, Bd. 25 S. 101.
Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmacologie, Bd. 35 (1895) S. 342.
Fränkel, Dr. Sigmund, Arzneimittel-Synthese, Wien 1901.
Kunkel, Prof. A. J., Handbuch der Toxicologie 1902.
Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Jahrg. 35 (1902) S. 24.

Druck von J. J. Weber, Leipzig.

Lebenslauf.

Am 25. Juni 1877 wurde ich, Hans Otto Wilhelm Kleist, zu Berlin als Sohn des jetzigen Kanzleirates Otto Kleist gehoren. Nachdem ich von Michaelis 1883 bis Michaelis 1886 auf der Vorschule des Kgl. Friedrich Wilhelms-Gymnasium, zu Berlin den ersten Unterricht genossen hatte, besuchte ich von Michaelis 1886 bis Michaelis 1896 das Kgl. Friedrich Wilhelms-Gymnasium zu Berlin, von Michaelis 1896 bis Michaelis 1898 das Kgl. Gymnasium zu Dramburg (Pom.). Die Berechtigung zum Einjährig-freiwilligen Militärdienst erlangte ich Michaelis 1894, das Reifezeugnis Michaelis 1898. Nachdem ich das Gymnasium verlassen hatte, widmete ich mich dem Studium der Medicin, und zwar war ich von Michaelis 1898 bis Ostern 1901 an der Friedrich Wilhelms-Universität zu Berlin, von Ostern 1901 bis Ostern 1903 an der Landesuniversität zu Rostock immatrikuliert. Michaelis 1900 bestand ich die ärztliche Vorprüfung zu Berlin, am 6. August 1903 das medicinische Staatsexamen an der Landesuniversität zu Rostock.

Vorlesungen habe ich gehört bei folgenden Herren:

a) in Berlin:

Prof. Dr. Waldeyer, Prof. Dr. H. Virchow, Prof. Dr.

Hertwig, Prof. Dr. Warburg, Prof. Dr. Engelmann, Prof. Dr. Jolly, Prof. Dr. Senator, Prof. Dr. v. Leyden, Prof. Dr. Busch, Dr. R. Krause, Dr. Michaelis, Dr. Langgaard.

b) in Rostock:

Geh. Obermedicinalrat Prof. Dr. Th. Thierfelder, Geh. Medicinalrat Prof. Dr. Schatz, Prof. Dr. Alb. Thierfelder, Prof. Dr. Langendorff, Obermedicinalrat Prof. Dr. Schuchardt, Kais. Russ. Staatsrat Prof. Dr. Barfurth, Prof. Dr. Axenfeld, Kais. Russ. Staatsrat Prof. Dr. R. Kobert, Prof. Dr. Martius, Prof. Dr. Pfeiffer, Prof. Dr. Graser, Prof. Dr. Gies, Prof. Dr. Körner, Prof. Dr. Müller, Prof. Dr. Peters, Dr. Ehrich, Dr. Ricker, Dr. Büttner, Dr. Kühn.